

**PERBANDINGAN AKTIVITAS SPESIFIK EKSTRAK KASAR ENZIM BROMELIN BUAH NANAS
YANG DIISOLASI DENGAN BEBERAPA JENIS GARAM PENGENDAP**

I. A. Preharsini Kusuma, A. A. I. A. M. Laksmiwati, Made Arsa, dan Ketut Ratnayani

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali

Email : preharsinik@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui perbandingan aktivitas spesifik (kemurnian) enzim bromelin ekstrak kasar buah nanas (varietas *Queen*) dengan metode *salting out* yang menggunakan tiga jenis garam, diantaranya $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, dan garam tradisional Kusamba (Bali). Ekstrak kasar enzim bromelin diperoleh dengan metode pengendapan oleh garam dengan tingkat kejenuhan yang berbeda. Penentuan aktivitas spesifik ekstrak kasar tersebut meliputi penentuan konsentrasi protein total dengan metode Biuret dan pengujian aktivitas protease dengan metode Anson. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi hasil *salting out* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl dan garam tradisional Kusamba secara berturut-turut sebagai berikut : 0,2887 U/mg (pada kejenuhan 20%); 0,2705 U/mg (pada kejenuhan 40%); dan 0,1623 U/mg (pada kejenuhan 80%) dengan perbandingan 1 : 0,94 : 0,56. Hasil fraksinasi dengan kedua garam tersebut memiliki nilai aktivitas spesifik yang lebih rendah dibandingkan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, diduga disebabkan oleh kekuatan ion yang lebih rendah pada NaCl dan kehadiran ion-ion lain pada garam tradisional Kusamba serta kelarutan enzim bromelin yang berbeda-beda pada jenis garam tertentu. Namun, perbandingan NaCl yang mendekati $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan ketersediaan garam tradisional Kusamba yang melimpah dapat menjadi alternatif pengganti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dalam fraksinasi enzim bromelin dari ekstrak kasar buah nanas.

Kata kunci : buah nanas, enzim bromelin, *salting out*, aktivitas spesifik

ABSTRACT

The aim of this research was to find specific activity of bromelain enzyme extracted from crude extract of pineapple fruit (Queen variety) by salting out method using three different salts, which were $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, and Kusamba traditional salt. Crude extract of bromelain enzyme was obtained by precipitation method using salt with different levels of saturation. This study included determination of total protein concentration by using Biuret method and protease activity by using Anson method to get the specific activities of the crude extract. The results showed that the highest specific activities of bromelain enzymes precipitated with the three salts $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl and Kusamba traditional salt with the ratio of 1: 0.94: 0.56 were 0.2887 U/mg (at 20% saturation) ; 0.2705 U/mg (at 40% saturation) and 0.1623 U/mg (at 80% saturation). Fractination of enzyme with the NaCl and Kusamba traditional salt gave smaller specific activity value than $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. This results may caused of NaCl had smaller ionic strength, the presence of other ions in Kusamba traditional salt and the different solubility of bromelain enzyme in different salts. However, due to the ratio of NaCl approached $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and the availability of Kusamba traditional salt they could be used as alternative salts to replace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in fractination bromelain enzyme from crude extract of pineapple fruit

Keywords : pineapple fruit, bromelain enzyme, salting out, specific activity

PENDAHULUAN

Tanaman nanas (*Ananas comosus L.Merr*) merupakan tanaman yang tumbuh pada iklim

tropis, seperti di Indonesia. Tanaman nanas mengandung enzim protease yang disebut enzim bromelin. Pemanfaatan enzim bromelin dapat diterapkan pada bidang medis yakni digunakan

sebagai agen anti-inflamasi pada inflamasi akut dan luka bakar. Pada bidang industri, pemanfaatan enzim bromelin meliputi industri pangan, industri tekstil, dan industri kosmetik (Bala *et al.*, 2012). Penggunaan enzim bromelin pada berbagai industri menjadi alasan diperlukannya suatu metode untuk memperoleh enzim bromelin secara sederhana sehingga dapat diperoleh enzim bromelin yang bernilai ekonomis serta memiliki aktivitas yang tinggi.

Tingkat kemurnian atau jumlah enzim bromelin dapat diketahui melalui penentuan aktivitas spesifik. Aktivitas spesifik dinyatakan dalam unit aktivitas enzim per miligram protein total (U/mg) (Halkerston, 2012). Metode isolasi enzim merupakan tahapan penting dalam memperoleh enzim dari sumbernya. Metode *salting out* lebih stabil terhadap isolat dibandingkan metode isolasi berdasarkan kelarutan lainnya, serta prosesnya lebih mudah dan sederhana.

Berdasarkan pada potensi garam sebagai pengendap protein, maka perlu dilakukan perbandingan aktivitas spesifik enzim bromelin buah nenas dengan teknik isolasi yang sederhana dan ekonomis menggunakan beberapa jenis garam. Garam yang digunakan antara lain $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl dan garam tradisional Kusamba. Penentuan aktivitas spesifik ekstrak kasar tersebut meliputi penentuan konsentrasi protein total dengan metode Biuret dan pengujian aktivitas protease dengan metode Anson.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain : buah nenas (varietas *Queen*), garam tradisional Kusamba yang diperoleh dari Desa Kusamba, Klungkung, Bali, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, Buffer fosfat 0,05 M pH 7, Kasein 0,65% (b/v), *Bovine Serum Albumin* (BSA), reagen Biuret, *Trichloroacetic Acid* (TCA), L-tirosin, reagen Folin Ciocalteu dan Na_2CO_3 0,5 M.

Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas, blender, pisau, lemari es, pipet mikro (*Mettler Toledo*), tip pipet mikro,

termometer, sentrifuse (*Yenaco*), neraca analitik (*Shimadzu*), inkubator (*Memmert*), vortex (*Maxi Mix II Barnstead Thermolyne*), pH meter (*Schott*), Spektrofotometer UV-Vis (double beam *Shimadzu/UV-1800*).

Cara Kerja

Penyiapan ekstrak buah nenas

Buah nenas dikupas dan dibersihkan, sebanyak 500 gram diblender sampai halus dan disaring sampai diperoleh sarinya. Kemudian sari nenas disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit sampai diperoleh supernatan.

Isolasi ekstrak kasar enzim bromelin buah nenas dengan metode salting out

Isolasi enzim bromelin dari supernatan buah nenas secara *salting out* dengan tiga jenis garam ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl dan garam tradisional Kusamba) dilakukan dengan menambahkan larutan garam dengan tingkat kejenuhan 10; 20; 40; 60 dan 80% dengan pengadukan secara perlahan. Larutan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam (semalam). Campuran endapan yang diperoleh kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Endapan protein tersebut kemudian dilarutkan dalam 0,05 M buffer fosfat pH 7 sampai volume 3 mL (selanjutnya disebut larutan ekstrak). Larutan ekstrak hasil isolasi dengan metode *salting out* pada berbagai tingkat kejenuhan disebut Larutan A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ (untuk $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$); B₁, B₂, B₃, B₄, B₅ (untuk NaCl), dan C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ (untuk garam tradisional Kusamba). Selanjutnya, masing-masing larutan ekstrak ditentukan konsentrasi proteinnya dan aktivitas enzimnya untuk memperoleh aktivitas spesifik dari tiap ekstrak kasar enzim bromelin.

Penentuan konsentrasi protein dengan spektrofotometri metode Biuret (AOAC, 1995)

Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 545,2 nm.

Pembuatan kurva standar

Sebelum dilakukan penentuan konsentrasi protein pada larutan enzim, terlebih dahulu dibuat konsentrasi larutan standar BSA dengan variasi 1; 2; 4 dan 8 mg/mL. Sebanyak 1 mL standar dari masing-masing konsentrasi dipipet dan ditambahkan 4 mL reagen Biuret. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 545,2 nm. Selanjutnya dibuat kurva standar antara

konsentrasi standar BSA pada sumbu x dengan absorbansi masing-masing standar pada sumbu y.

Penentuan konsentrasi protein ekstrak buah nanas

Penentuan konsentrasi protein total ekstrak buah nanas hasil isolasi dengan beberapa jenis garam dilakukan dengan cara memipet 1 mL masing-masing larutan A, B, C kemudian ditambahkan 4 mL reagen biuret. Larutan diaduk dan didiamkan selama 20 menit pada suhu kamar kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 545,2 nm. Konsentrasi protein total dapat dihitung menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva standar BSA.

Pengujian aktivitas protease ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas (Anson, 1938 dalam Sigma 1999)

Penentuan panjang gelombang maksimum dan kurva standar

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 729,6 nm. Selanjutnya dibuat kurva standar antara konsentrasi standar L-Tirosin pada sumbu x dengan absorbansi masing-masing standar pada sumbu y. Konsentrasi L-Tirosin pada sampel selanjutnya dapat dihitung berdasarkan persamaan regresi linier yang diperoleh.

Pengujian aktivitas enzim

Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan cara sebagai berikut, sebanyak 2,5 mL kasein 0,65% (b/v) dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung uji dan diinkubasi pada suhu 37°C. Larutan kasein ditambah 0,5 mL larutan A (larutan ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas hasil pengendapan garam (NH₄)₂SO₄) kemudian diaduk dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Selanjutnya, campuran tersebut ditambah 5 mL *Trichloroacetic Acid* (TCA) 0,11 M untuk menghentikan reaksi enzimatik. Kemudian campuran diaduk dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Pada pembuatan blanko sampel dilakukan prosedur yang sama, namun terdapat perbedaan pada tahap penambahan larutan A. Pada blanko, penambahan larutan A dilakukan setelah kasein ditambahkan TCA kemudian tahap selanjutnya sama dengan pengujian sampel. Prosedur yang sama juga dilakukan pada pengujian larutan B (NaCl) dan larutan C (garam tradisional Kusamba).

Selanjutnya dilakukan reaksi pewarnaan, supernatan dari larutan sampel hasil sentrifugasi dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 2,5 mL Na₂CO₃ 0,5 M serta 0,5 mL reagen Folin Ciocalteu. Setelah itu, absorbansinya diukur pada panjang gelombang 729,6 nm. Hal yang sama dilakukan pada supernatan dari larutan blanko. Aktivitas protease enzim dapat ditentukan dengan rumus berikut (Sigma, 1999) :

$$\text{Unit/mol} = \frac{\mu\text{mol tirosin} \times \text{vol. total reaksi (mL)}}{\text{vol. sampel (mL)} \times \text{waktu reaksi (menit)} \times \text{vol. uji (mL)}}$$

Penentuan aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas (Sigma, 1999)

Aktivitas spesifik didefinisikan sebagai unit aktivitas enzim (U/mL) dibagi dengan konsentrasi protein total (mg/mL) dan dapat diperoleh dengan menggunakan rumus (Sigma, 1999) :

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas Enzim (U/mL)}}{\text{Konsentrasi protein total (mg/mL)}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengendapan Protein Total Ekstrak Buah Nanas

Garam yang efektif dalam mengendapkan protein adalah garam yang memiliki jumlah muatan (anion) multivalen. Kemampuan anion dalam proses *salting out* berdasarkan deret Hofmeister adalah sebagai berikut : PO₄³⁻ > SO₄²⁻ > COO⁻ > Cl⁻ dan kemampuan kation monovalen adalah sebagai berikut : NH₄⁺ > K⁺ > Na⁺ (Scopes, 1982). Kemampuan masing-masing garam ((NH₄)₂SO₄, NaCl dan garam tradisional Kusamba) dalam mengendapkan protein dilihat dari konsentrasi protein yang dihasilkan dari pengendapan oleh tiap garam. Setelah penambahan reagen Biuret, terbentuk warna biru transparan sampai warna ungu. Analisis dilanjutkan dengan pengukuran absorbansi dengan Spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 545,2 nm. Persamaan regresi linier yang diperoleh adalah y = 0,041078 x + 0,008206. Data konsentrasi protein disajikan pada Tabel 1 dan grafik perbandingan konsentrasi protein ekstrak buah nanas hasil pengendapan

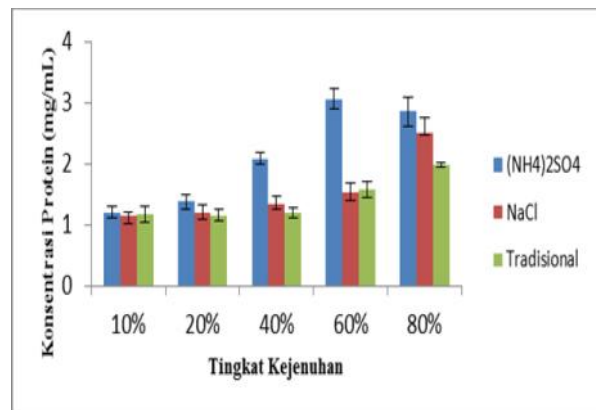
(NH₄)₂SO₄, NaCl dan garam tradisional Kusamba disajikan pada Gambar 1.

Tabel 1. Konsentrasi protein ekstrak buah nanas hasil pengendapan garam (NH₄)₂SO₄, NaCl dan garam tradisional Kusamba

No	Jenis Garam	Tingkat kejenuhan (%)	Konsentrasi Protein (mg/mL)
1.	(NH ₄) ₂ SO ₄	10	1,2000 ± 0,09565
		20	1,3818 ± 0,11920
		40	2,0853 ± 0,09043
		60	3,0550 ± 0,16745
		80	2,8505 ± 0,24160
2.	NaCl	10	1,1400 ± 0,06397
		20	1,1919 ± 0,12286
		40	1,3282 ± 0,14105
		60	1,5213 ± 0,15815
		80	2,4967 ± 0,26618
3.	Garam tradisional	10	1,1708 ± 0,12155
		20	1,1562 ± 0,09580
		40	1,1830 ± 0,08222
		60	1,5822 ± 0,12711
		80	1,9823 ± 0,03065

Grafik pada Gambar 1 menunjukkan bahwa konsentrasi protein ekstrak kasar buah nanas yang diendapkan dengan (NH₄)₂SO₄ mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya kejenuhan larutan garam sampai pada tingkat kejenuhan 60% dengan nilai (3,0550 ± 0,16745) mg/mL. Hal tersebut disebabkan oleh semakin banyaknya jumlah ion garam yang mengikat air sehingga semakin banyak endapan

protein yang terbentuk. Namun terjadi penurunan konsentrasi protein pada tingkat kejenuhan 80% yang kemungkinan disebabkan oleh protein tersebut tidak mengendap lagi pada kejenuhan garam (NH₄)₂SO₄ 80% karena tiap jenis protein memiliki kelarutan yang berbeda-beda pada kondisi tertentu.



Gambar 1. Grafik perbandingan konsentrasi protein ekstrak buah nanas hasil pengendapan (NH₄)₂SO₄, NaCl dan garam tradisional Kusamba

Pada grafik hasil pengendapan NaCl, konsentrasi protein total tertinggi adalah (2,4967 ± 0,26618) mg/mL pada kejenuhan 80%. Selama proses *salting out*, NaCl memiliki kemampuan mengendapkan protein karena dapat mengikat air sehingga menurunkan kelarutan protein. Selain itu, NaCl juga termasuk garam anti-kaotropik (Farrah *et.al.*, 1981) yakni jenis garam yang tidak merusak struktur protein.

Garam tradisional yang digunakan pada penelitian ini merupakan garam tradisional yang diperoleh dari Desa Kusamba, Klungkung. Alasan penggunaan garam tradisional sebagai pengendap protein mengingat komponen penyusunnya yang sebagian besar terdiri dari ion Na⁺ dan ion Cl⁻ (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2013) yang memiliki kemampuan untuk berikatan dengan air sehingga protein yang terkandung pada ekstrak buah nanas dapat mengendap. Garam tradisional Kusamba mengendapkan protein secara maksimal pada tingkat kejenuhan 80% dengan nilai konsentrasi protein sebesar (1,9823 ± 0,03065) mg/mL.

Berdasarkan hasil uji ANOVA Satu Jalan, pada tingkat kejenuhan 10 % dan 20%, nilai $p > 0,05$ sehingga H_0 diterima, artinya tidak terdapat perbedaan bermakna pada kejenuhan 10% dan 20%. Kemudian pada tingkat kejenuhan 40; 60 dan 80% nilai $p < 0,05$ sehingga H_0 ditolak, artinya terdapat perbedaan bermakna pada konsentrasi protein sebagai hasil dari pengendapan ketiga jenis garam. Pengujian dilanjutkan dengan uji Tukey/HSD. Hasil uji Tukey/HSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan konsentrasi protein dari ketiga jenis garam tersebut pada tingkat kejenuhan 40; 60 dan 80%.

Perbandingan konsentrasi protein tertinggi dari hasil pengendapan garam $(NH_4)_2SO_4$: NaCl : garam tradisional Kusamba adalah **1 : 0,82 : 0,65**. Hal tersebut sesuai dengan deret Hofmeister, yakni ditinjau dari anion dan kationnya, $(NH_4)_2SO_4$ merupakan garam yang paling efektif dalam proses *salting out* dibandingkan dua garam lainnya .

Pengujian aktivitas protease dari masing-masing ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas

Absorbansi larutan filtrat setelah penambahan reagen Folin Ciocalteu diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yaitu pada 729,6 nm. Absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan $y = 3,074 x + 0,01026$. Data nilai aktivitas protease ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas disajikan pada Tabel 2 dan grafik perbandingan aktivitas protease ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas hasil pengendapan $(NH_4)_2SO_4$, NaCl dan garam tradisional disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan grafik pada Gambar 2, nilai aktivitas protease enzim bromelin hasil pengendapan $(NH_4)_2SO_4$ yang paling tinggi diperoleh pada kejenuhan 60% dengan nilai aktivitas enzim sebesar $(0,4980 \pm 0,00868)$ U/mL. Nilai aktivitas enzim mengalami peningkatan sampai tingkat kejenuhan 60% dan mengalami penurunan pada tingkat kejenuhan 80%. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh protein enzim bromelin dapat diendapkan dengan optimal pada kejenuhan 60% sedangkan pada 80% masih terdapat sisa enzim yang masih dapat terendapkan.

Nilai aktivitas protease enzim hasil pengendapan NaCl yang paling tinggi diperoleh pada kejenuhan 40% dengan nilai

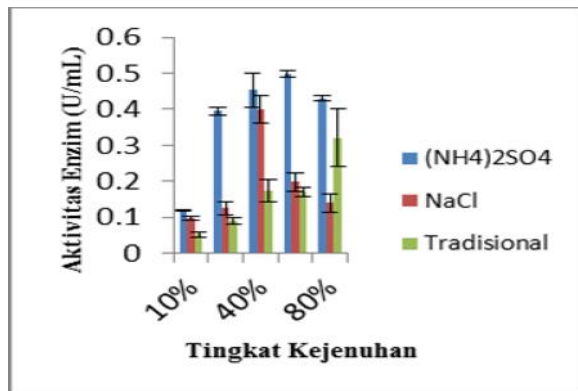
aktivitas enzim sebesar $(0,3999 \pm 0,03853)$ U/mL. Nilai aktivitas enzim mengalami peningkatan sampai pada tingkat kejenuhan 40% dan mengalami penurunan pada tingkat kejenuhan 60% sampai 80%. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh enzim bromelin yang terendapkan oleh NaCl dapat terendapkan secara optimal pada kejenuhan 40%.

Tabel 2. Aktivitas protease enzim bromelin hasil pengendapan garam $(NH_4)_2SO_4$, NaCl dan garam tradisional

No.	Jenis Garam	Tingkat kejenuhan (%)	Aktivitas protease (U/mL)
1.	$(NH_4)_2SO_4$	10	0,1191 ± 0,00123
		20	0,3960 ± 0,01118
		40	0,4537 ± 0,04735
		60	0,4980 ± 0,00868
		80	0,4300 ± 0,00796
2.	NaCl	10	0,0971 ± 0,00566
		20	0,1256 ± 0,01868
		40	0,3999 ± 0,03853
		60	0,1980 ± 0,02475
		80	0,1402 ± 0,02598
3.	Garam tradisional	10	0,0532 ± 0,00758
		20	0,0902 ± 0,00825
		40	0,1736 ± 0,03211
		60	0,1703 ± 0,01098
		80	0,3210 ± 0,08051

Nilai aktivitas protease enzim hasil pengendapan garam tradisional yang paling tinggi terdapat pada kejenuhan 80% dengan nilai aktivitas enzim sebesar $(0,3210 \pm 0,08051)$ U/mL.

Tingkat kejenuhan 80% menghasilkan ekstrak kasar enzim bromelin dengan aktivitas tertinggi. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh enzim bromelin yang terendapkan oleh garam tradisional paling banyak terdapat pada kejenuhan 80%.



Gambar 2. Grafik perbandingan aktivitas protease ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas hasil pengendapan (NH₄)₂SO₄, NaCl dan garam tradisional

Aktivitas spesifik dari masing-masing ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas

Teknik *salting out* tidak mengendapkan protein secara spesifik karena masih ada protein-protein lain dalam ekstrak buah nanas selain protein enzim bromelin yang ikut mengendap selama proses tersebut. Konsentrasi protein yang tinggi tidak selalu sebanding dengan aktivitas protease enzim bromelin. Hal ini dikarenakan kehadiran protein lain selain enzim bromelin yang ikut terukur pada penentuan konsentrasi protein total. Oleh sebab itu, konsentrasi protein total yang tinggi tidak selalu menunjukkan aktivitas enzim yang tinggi sehingga perlu dilakukan penentuan aktivitas spesifik. Hal ini terbukti dari hasil penelitian yang diperoleh, yakni konsentrasi protein total hasil pengendapan NaCl dan garam tradisional Kusamba yang tidak selalu sebanding dengan aktivitas enzim. Sebagai contoh adalah hasil pengendapan NaCl. Pada kejenuhan 10% sampai 80%, konsentrasi protein total pada hasil pengendapan NaCl semakin meningkat seiring dengan meningkatnya kejenuhan. Namun, nilai aktivitas enzimnya mengalami penurunan mulai dari kejenuhan 60% dan 80%.

Semakin tinggi aktivitas spesifik menunjukkan semakin banyak jumlah enzim bromelin yang berhasil diendapkan dibandingkan protein lain pada tingkat kejenuhan tertentu (isolat yang diperoleh semakin murni). Variasi tingkat kejenuhan garam pada proses pengendapan enzim bromelin buah nanas dilakukan untuk mengetahui kemampuan garam dalam mengendapkan protein enzim agar diperoleh jumlah enzim yang optimal yang kemudian dilihat dari nilai aktivitas spesifik yang diperoleh. Data nilai aktivitas spesifik pada hasil pengendapan oleh tiap garam disajikan pada Tabel 3 dan grafik perbandingan aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas hasil pengendapan (NH₄)₂SO₄, NaCl dan garam tradisional Kusamba disajikan pada Gambar 3.

Berdasarkan Tabel 3, nilai aktivitas spesifik tertinggi hasil pengendapan (NH₄)₂SO₄ diperoleh pada tingkat kejenuhan 20% dengan nilai (0,2887 ± 0,03202) U/mg. Nilai aktivitas spesifik tertinggi hasil pengendapan NaCl diperoleh pada tingkat kejenuhan 40% dengan nilai (0,2705 ± 0,01845) U/mg. Nilai aktivitas spesifik tertinggi hasil pengendapan garam tradisional diperoleh pada tingkat kejenuhan 80% dengan nilai (0,1623 ± 0,04288) U/mg.

Nilai aktivitas spesifik tertinggi yang dihasilkan dari pengendapan (NH₄)₂SO₄ terdapat pada kejenuhan 20%, hal ini menunjukkan bahwa pada tingkat kejenuhan tersebut, jumlah enzim bromelin yang diperoleh paling banyak walaupun konsentrasi protein total yang diperoleh lebih rendah dari tingkat kejenuhan 40-80%. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh enzim bromelin yang diendapkan dengan (NH₄)₂SO₄ lebih mudah diperoleh pada tingkat kejenuhan 20%.

Nilai aktivitas spesifik tertinggi yang dihasilkan dari pengendapan NaCl terdapat pada kejenuhan 40% walaupun konsentrasi protein total tertinggi dihasilkan pada kejenuhan 80%. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi protein total tidak selalu sebanding dengan aktivitas enzim bromelin yang kemungkin disebabkan oleh enzim bromelin yang diisolasi dengan NaCl lebih mudah diperoleh pada tingkat kejenuhan 40%.

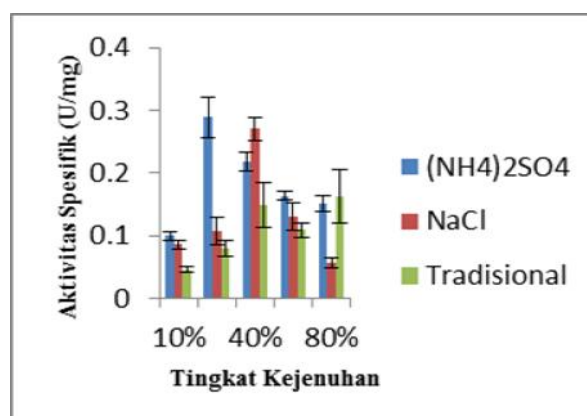
Nilai aktivitas spesifik tertinggi yang dihasilkan dari pengendapan garam tradisional terdapat pada kejenuhan 80%. Berdasarkan grafik, nilai aktivitas spesifik mengalami peningkatan dari

kejenuhan 10% sampai 40%. Kemudian mengalami penurunan pada kejenuhan 60% dan pada 80% mengalami kenaikan dan merupakan tingkat kejenuhan dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi. Nilai aktivitas spesifik yang naik-turun kemungkinan disebabkan oleh pengaruh ion-ion lain yang terdapat dalam garam tradisional. Kehadiran ion-ion lain selain Na^+ dan Cl^- misalnya K^+ , Mg^{2+} dan Ca^{2+} (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2013) kemungkinan dapat mempengaruhi kemampuan garam tradisional dalam mengendapkan enzim bromelin.

Tabel 3. Aktivitas spesifik enzim bromelin hasil pengendapan garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl dan garam tradisional Kusamba

No.	Jenis Garam	Tingkat kejenuhan (%)	Aktivitas spesifik (U/mg)
1.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	0,0996 ± 0,00726
		20	0,2887 ± 0,03202
		40	0,2172 ± 0,01546
		60	0,1632 ± 0,00622
		80	0,1516 ± 0,01275
2.	NaCl	10	0,0854 ± 0,00761
		20	0,1065 ± 0,02136
		40	0,2705 ± 0,01845
		60	0,1310 ± 0,02182
		80	0,0562 ± 0,00800
3.	Garam tradisional	10	0,0455 ± 0,00525
		20	0,0788 ± 0,01305
		40	0,1484 ± 0,03568
		60	0,1082 ± 0,01233
		80	0,1623 ± 0,04288

Nilai aktivitas spesifik dari hasil pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl dan garam tradisional Kusamba dapat terganggu dengan adanya sisa garam pada endapan selama proses *salting out*. Oleh sebab itu, untuk selanjutnya diperlukan adanya pemurnian ekstrak kasar enzim bromelin untuk meminimalkan gangguan dari sisa garam tersebut. Salah satu pemurnian hasil *salting out* adalah teknik dialisis, yakni difusi zat terlarut melalui membran semipermeabel. Selama proses dialisis sisa garam dapat dipisahkan dari protein (Budiman, 2011).



Gambar 3. Grafik perbandingan aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas hasil pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl dan garam tradisional Kusamba

Berdasarkan hasil uji ANOVA, nilai $p < 0,05$ sehingga H_0 ditolak, artinya terdapat perbedaan bermakna pada nilai aktivitas spesifik enzim bromelin sebagai hasil dari pengendapan ketiga jenis garam tersebut. Pengujian dilanjutkan dengan uji Tukey/HSD. Hasil uji Tukey/HSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nilai aktivitas spesifik dari ketiga jenis garam tersebut pada tingkat kejenuhan 10% sampai 80%.

Perbandingan nilai aktivitas spesifik tertinggi hasil pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: NaCl : garam tradisional adalah **1 : 0,94 : 0,56**. Berdasarkan perbandingan tersebut, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ memiliki nilai aktivitas tertinggi dibandingkan dua garam lainnya. Hal ini diduga karena kekuatan ion pada NaCl yang lebih rendah dan kehadiran ion-ion lain pada garam tradisional Kusamba serta perbedaan kelarutan enzim bromelin pada jenis garam tertentu. Namun, rasio perbandingan NaCl yang mendekati $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ menjadi salah satu faktor pendukung penggunaan NaCl sebagai alternatif pengganti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dalam mengisolasi enzim bromelin dari ekstrak kasar buah nanas. Selain itu, penggunaan garam tradisional juga dapat menjadi alternatif pengganti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ karena ketersediaannya yang melimpah sehingga proses isolasi enzim bromelin ekstrak kasar buah nanas dapat dilakukan dengan sederhana dan ekonomis.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Kemampuan masing-masing garam ((NH₄)₂SO₄, NaCl, garam tradisional) dalam mengendapkan protein total secara berturut-turut adalah (NH₄)₂SO₄ > NaCl > garam tradisional Kusamba dengan perbandingan 1 : 0,82 : 0,65.
2. Nilai aktivitas spesifik tertinggi dari ekstrak kasar enzim bromelin buah nanas hasil pengendapan (NH₄)₂SO₄, NaCl dan garam tradisional Kusamba secara berturut-turut adalah sebagai berikut : 0,2887 U/mg (pada kejenuhan 20%); 0,2705 U/mg (pada kejenuhan 40%) dan 0,1623 U/mg (pada kejenuhan 80%) dengan perbandingan 1 : 0,94 : 0,56.

Saran

Diperlukan adanya proses pemurnian terlebih dahulu pada ekstrak hasil pengendapan garam agar gangguan pada penentuan aktivitas spesifik enzim bromelin dapat diminimalkan, misalnya dengan teknik dialisis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC, 1995, *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist*, AOAC, Washington DC.
- Bala, M., Nurul A. Ismail, Maizirwan M., Mohamed S. Jami, Hamzah M. Salleh, and Azura A., 2012, Bromelain Production: Current Trends and Perspective, *Archives Des Sciences*, 65 (11) :
- Bintang, M., 2010, *Biokimia Teknik Penelitian*, Erlangga, Jakarta
- Budiman, 2011, Isolasi Enzim -Glukosidase dari Gabah (*Oryza sativa* var. Ciherang), *Skripsi*, Universitas Indonesia, Jakarta
- Farrah, S.R., Dinesh O. Shah., and Lonnie O. Ingram., 1981, Effect of chaotropic and antichaotropic agents on elution of poliovirus adsorbed on membrane filters, *Proc.Natl. Acad. Sci.*, 78 (2) : 1229-1232
- Gautam, S.S., S.K. Mishra, V. Dash, and Amit K., Goyal, and G. Rath, 2010, Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant, *J. Pharm Sci.*, 34 : 67-76
- Halkerston, Ian D.K., 2012, *Sinopsis Biokimia Jilid Satu*, a.b. Rudiharso, W., Binarupa Aksara Publisher, Tangerang Selatan
- Handayani, W., A.A.I. Ratnadewi, dan Agung B. Santoso, 2007, Pengaruh Variasi Konsentrasi Sodium Klorida terhadap Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (*Sardinella lemuru* Bleeker, 1853) oleh Protease Ekstrak Nanas (*Ananas comosus* [L.] Merr. var. *Dulcis*), *Jurnal Teknologi Proses*, 6 (1) : 1-9
- Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2013, *Pembuatan Garam Bermutu*, Direktorat Pemberdayaan Masyarakat Pesisir dan Pengembangan Usaha dan Direktorat Jenderal Kelautan dan Pulau-pulau Kecil Kementerian Kelautan dan Perikanan, Jakarta
- Sigma, 1999, *Enzymatic Assay of Protease : Casein as A Substrat*, Sigma Quality Control Test Procedure
- Scopes, R.K., 1982, *Protein Purification Principle and Practice*, Springer-Verlag, New York
- Wuryanti, 2004, Isolasi dan Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin Dari Buah Nanas (*Ananas comosus* L.), *JKSA*. VII (3) : 83-87